第５講　遺伝子導入・グルコース輸送体

(A)　ある種のウイルスは，感染すると宿主細胞のゲノム DNA に自分のゲノム由来 DNA を挿入させることができる。いったん挿入されたウイルス DNA（プロウイルス）は，宿主細胞ゲノム DNA の一部として複製される。そのため，この性質をもつウイルスをもとにして作製されたベクターは，宿主細胞に遺伝子を安定して導入する手段として生物学の研究に広く用いられてきた。

宿主細胞ゲノム DNA におけるプロウイルスの挿入場所は前もってわからない。そこで，プロウイルスの挿入場所を調べるため以下の実験を行った。**図１**は実験過程を示し，図中の直線状，環状の二重線は，DNA 二本鎖を表す。二重線間の細い線は相補結合（一部）を示す。プロウイルスの塩基配列は，すでにわかっているものとする。

実験：ウイルスベクターをヒトから得た細胞に感染させ，プロウイルスをもつ細胞から DNA を抽出した。抽出した DNA に，プロウイルスを一か所で切断する制限酵素 X（DNA 鎖を２本とも同じところで切断するタイプの酵素）を加え 37℃で２時間反応させると，宿主 DNA も切断され，DNA 断片(ア)が得られた。p，q，r，s はプロウイルス内の塩基を表している。s はプロウイルスの末端にあり，p は切断末端にある。また，p−q，r−s はそれぞれ 20 塩基長である。①次に DNA 断片(ア)を含む溶液から制限酵素 X を除去し，②リガーゼを加え，断片の末端どうしを連結させ，環状 DNA (イ)を得た。さらに，環状 DNA (イ)を含む溶液に，プロウイルスの q−r 間をある一か所のみで切断する制限酵素 Y を加え，37℃で２時間反応させ，**図１**に示すような DNA 断片(ウ)を得た。その DNA 断片(ウ)を鋳型とし，p−q，r−s の配列をもとに作製したこれらと同じ塩基長のプライマーを用いて PCR 法による増幅を行った。③その結果，280 塩基対長の DNA 断片 q−r が増幅された。

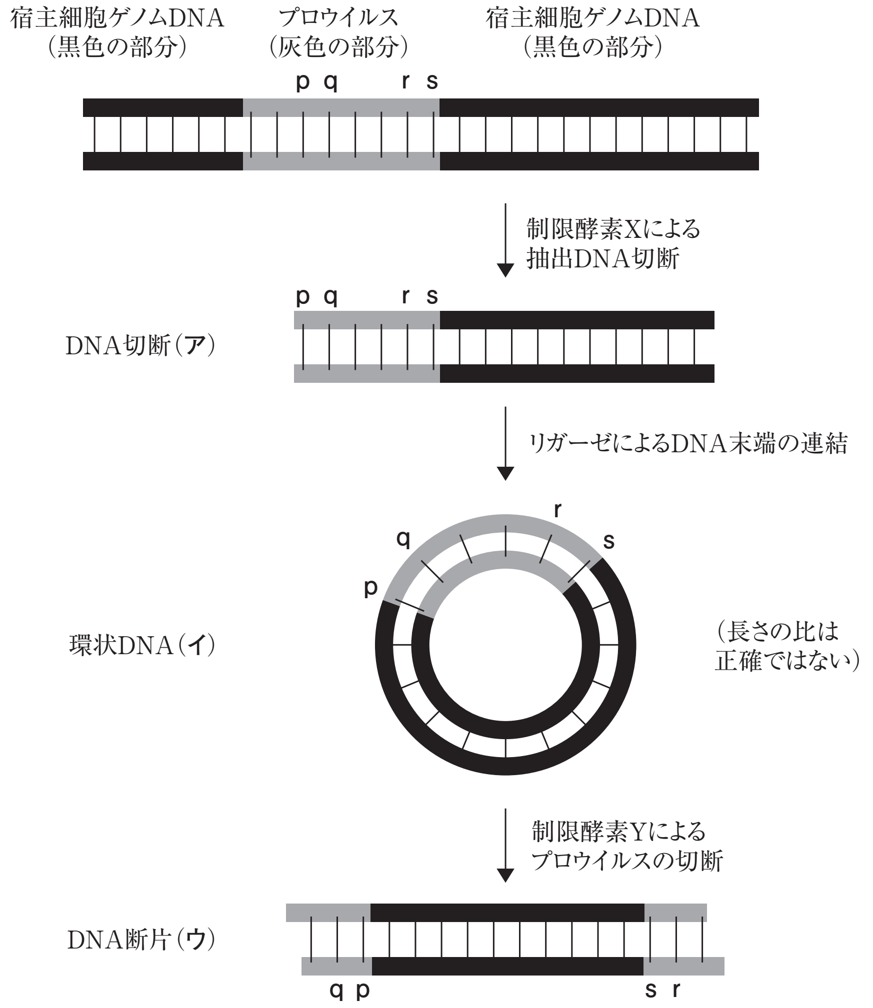

図１

問１　下線部①に関して，制限酵素を除去しなければ，以降の実験にどのような影響があるか。解答欄の枠の範囲内で記せ。

問２　下線部②について，なぜリガーゼによりDNA断片(ア)をいったん環状DNA(イ)にしたのか。その理由を解答欄の枠の範囲内で記せ。

問３　下線部③について，増幅産物にふくまれる宿主由来部分の塩基対長を答えよ。

問４　下線部③で得られた増幅産物を使って，プロウイルスの宿主DNAへの挿入場所を調べたい。その方法を解答欄の枠の範囲内で記せ。

(B)　グルコースのような電荷を持たない比較的小さな分子でも，単純拡散によって脂質二重膜を透過することはほとんどできない。しかし，グルコースは細胞内のエネルギー代謝のもとになる重要な物質で，すみやかに細胞内に供給される必要がある。そこで細胞は，細胞膜の表面にある「グルコース輸送体」を用いてグルコースを促進拡散させることにより，すみやかにグルコースを細胞内に供給している。単純拡散や促進拡散による物質輸送は，ともに細胞からのエネルギーを必要とせず，細胞内と細胞外の物質の濃度勾配を利用しているため，［　ア　］と呼ばれる。

ある均一な細胞の細胞外のグルコース濃度に対するグルコース取り込み速度を，一定数の細胞で測定した結果を**図２**に示す。細胞外のグルコース濃度が高くなると，輸送体によるグルコース取り込み速度は，ある一定の最大値に近づいていく。これは，グルコース輸送体がグルコースの輸送を触媒する酵素のように振る舞うことを示している。このときのグルコース取り込み速度の最大値を V_{max} とする。また，グルコース取り込み速度が V_{max} の半分を示すグルコース濃度を K_m とする。K_m はグルコースと輸送体の結合の強さを表す定数であり，値が小さいほど結合が強いことを意味する。**図２**より，グルコース輸送体の K_m は［　イ　］mmol/L（mmol：ミリモル，1mmol＝1×10^{-3}mol）であることが読み取れる。**図２**と同じ測定条件下で，グルコース輸送体の阻害剤 A をこの細胞に添加したときのグルコース取り込み速度を測定した結果を**図３**に示す。

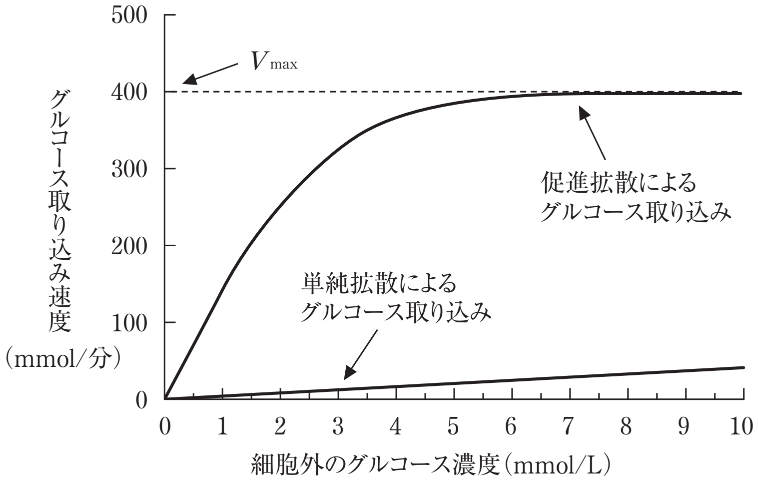

図２

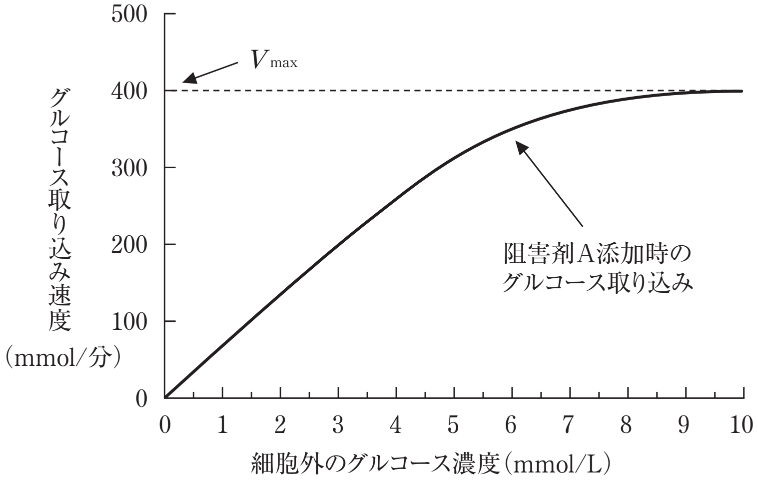

図3

問５　文中の［ア］，［イ］に適切な語句または数値を記入せよ。

問６　**図３**の結果から，阻害剤 A がグルコースの取り込みを阻害するしくみを，「結合部位」という用語を用いて解答欄の枠の範囲内で説明せよ。

次に，**図２**の測定で用いた細胞をがん化させて異常細胞を作った。その異常細胞では，グルコース取り込み速度が正常細胞と比較して増加していた。そこで，その原因を検討するために，以下の実験１～実験３を行った。

実験１　正常細胞と異常細胞を用いて，**図２**と同じ実験条件下でグルコース取り込み速度を測定した。その結果，異常細胞は正常細胞と比較して 10 倍の速度で細胞内にグルコースを取り込んでいたことがわかった。さらに④正常細胞と異常細胞について V_{max} と K_m を比較した結果，異常細胞のグルコース取り込み速度の上昇は，細胞膜上のグルコース輸送体の数が増加したことによってもたらされたことがわかった。

実験２　タンパク質の合成を阻害する薬剤を正常細胞と異常細胞に添加した。その後，グルコース輸送体の数の経時変化を測定したところ，正常細胞と異常細胞の間でグルコース輸送体の分解速度に差はなかった。

実験３　正常細胞と異常細胞からそれぞれゲノム DNA を抽出し，グルコース輸送体遺伝子の数を比較したところ，両者の間に違いは見られなかった。

問７　下線部④の結果から，異常細胞を用いて得られた V_{max} と K_m は正常細胞の場合と比較してどのような値であったか。以下の(あ)～(お)から選べ。

(あ)　V_{max}：1 倍，　K_m：10 倍
(い)　V_{max}：$\sqrt{10}$ 倍，K_m：1 倍
(う)　V_{max}：10 倍，　K_m：1 倍
(え)　V_{max}：1 倍，　K_m：$\frac{1}{10}$倍
(お)　V_{max}：10 倍，　K_m：$\frac{1}{\sqrt{10}}$倍

問８　実験１～実験３の結果をふまえて，以下の(1)，(2)に答えよ。

(1)　異常細胞がどのようなしくみでグルコース輸送体の数を増加させたのか。考えられる仮説を解答欄の枠の範囲内で１つ記せ。

(2)　上の(1)で記した仮説を検証するために，どのような実験を行えばよいか。解答欄の枠の範囲内で１つ記せ。

< Note >

第５講

(A)

問１　リガーゼによって環状 DNA に連結されたものが，制限酵素の働きで再び元の線状の DNA 断片に戻ってしまう。

問２　制限酵素 Y で **q−r** を切断すると，宿主細胞の DNA 断片を塩基配列の分かっているプロウイルスの DNA 断片で挟むことになり，プライマーを結合させて PCR 法を用いて増殖させるのに都合がよくなるため。

問３　240 塩基対

問４　放射性同位体で標識したヌクレオチドを用いて PCR を行い放射活性を示す挿入場所付近の塩基配列を持った増幅産物を得る。それらを一本鎖にした宿主細胞の DNA と結合させることで染色体上の位置を特定する。

(B)

問５　**ア**　受動輸送　　**イ**　1.5

問６　阻害剤 A はグルコース輸送体のグルコースとの結合部位に結合することで，グルコース輸送体によるグルコースの輸送を競争的に阻害する。

問７　(う)

問８　(1)　ガン細胞では，グルコース輸送体の遺伝子について，１遺伝子座あたりの発現量が増加することで，膜上のグルコース輸送体量が 10 倍に増加していると考えられる。

(2)　異常細胞と正常細胞のグルコース輸送体の mRNA の量を比較して，異常細胞のほうが多いかどうかを調べる。